(19)日本国际部門(JP)

(12) 公開特許公報(4)

特開平10-45738

(二)特許出限公司4号

(43)公開日 平成10年(1998) 2月17日

יבווויי כו ו	E COLOR	中也就错误证	Ĺ	光
	C. THE C. S	いとはな事の		イルサルト
C 0 7 D 303/38			C 0 7 D 303/38	3/38
A 6 1 K 31/335	ABG		A 6 1 K 31/335	1/335 ABG
C12P 17/02			C 1 2 P 17/02	7/02
# (C 1 2 P 17/02				
C12R 1:01)				
			新 全四次	富産的次 未請求 耐水項の数3 0L(全 15 頁)
(21)出日本	你属平8 —199249		(1) 出間人	(71) 出版人 000173913
				財団法人衛生物化学研究会
(22)/HICH	平成8年(1996)7月29日	J129E	_	東京都品川区上大崎3丁月14番23号
			(72)発明者	おち 神様
				東京都品川区東五反田5丁目1番11号 二
				ューフジマンション701
			(72) 発明者	土田 外志夫
				种杂川県相模原市矢郎2丁目3番24号 ハ
				ーモニー矢能201号
			(72) 発明者	中村 光
				東京都台東区入谷2丁目39番地9号
			(74)代理人	弁理士 八木田 茂 (外2名)
				最終日に扱く

(54) [兜明の名称] - 抗生物質エポキシキノマイシンCおよびDとその観道技ならびに対リウマチ剤

(57) [野野)

【原因】 抗リウマチ活性を有し且つ新しい分子母格を **介する新規な化合物を提供することを目的とする。**

【解选单段】 一般共(二)

3

か/析机な抗生物質としてアミコラトプシス sp. MX299-9 エボキシキノマイシンDでは塩煮を示す)で扱わされる エボキシキノマイシンCもよびエボキシキノマイシンD 5F4 株の培養により得られた。エボキシキノマイシンC はよびひ、あるいはそれらの塩は抗リウマチ活性を存す る抗生物質である。また、先にほられた新規な抗生物質 で ある エポキシキ ご マイシン A ねよび エポキシキ ノレイ シンBも抗リウマチ活性を有することが見いだされた。 (虹中、RはエボキシキノマイシンCTは水敷を示し、

BEST AVAILABLE COPY

[加求項1] 次の一般式(1) [特許請求の範囲]

Ξ

(式中、RはエポキシキノマイシンCでは水素原子を示

で扱わされる化合物である抗生物質エポキシキノマイシ し、またエポキシキノマイシンDでは塩素原子を示す) ンCおよびエポキシキノマイシンD、またはそれらの

Cおよび(または) Dを採取することを特徴とする、抗 生物質エポキシキノマイシンCおよび(または)エポキ に記載のエポキシキノマイシンCおよびDの生産菌を栄 集箔地に箔養し、その箔盤物からエボキシキノマイシン 【桷求項2】 アミコラトプシス属に属する、櫛求項! ツキノレイツンロの製造符。

【順求項3】次の一般式(1)

Э

(式中、RはエポキシキノマイシンCでは水繋原子を示 で表わされる化合物である抗生物質エポキシキノマイシ ンCおよびエポキシキノマイシンD、ならびに次の一般 し、またエポキシキノマイシンDでは塩素原子を示す)

9

ンAおよびエポキシキノマイシンB、あるいはこれらの個から選ばれる少なくとも一つの化合物を有効成分とし (式中、RはエポキシキノマイシンAでは塩素原子を示 で表わされる化台物である抗生物質エポキシキノマイシ し、またエポキシキノマイシンBでは水素原子を示す) て含有することを特徴とするリウマヰ蓟。

【発明の詳細な説明】

[発明の属する技術分野] 本発明は、抗リウマ・活性を 示す新規化合物であるエポキシキノマイシン (Epoxyquin oulcin) こおよびエポキシキノマイシンD、あるいはこ れらの塩に間し、またエボキシキノマイシンCおよび (または) エボキシキノマイシンDの製造法に関する。

特閣平10-45738

2

り、また値々な多数の抗腫病性物質が知られている。他 およびエポキシキノマイシンBまたはそれらの塩のうち さらに本発明は、エポキシキノマイシンCおよび(また は)エボキシキノマイシンD、エボキシキノマイシンA の少なくとも一つの化合物を有効成分とする抗リウマチ 【従来の技術】種々な多数の抗菌性物質が知られてお [0002]

を有するものが多く、専性が低く且つ新規な化学構造を 方、従来のリウマチ治療には、ステロイド剤、酸性抗炎 [発明が解決しようとする課題] 細菌形染症の化学療法 において、従来知られまたは使用されている既知の抗菌 に窒まれている。また抗腫病性物質は、一般に強い専性 有する抗腫病性物質を発見または制製することが常に質 性化合物とは、異なる化学構造を有し且つ優れた抗菌活 性を示す新しい化合物の発見または創製をすることは常 まれており、そのための研究が行われている。 症剤または免疫調節剤等が使われている。 [0000]

8

【0004】また、従来のリウマモ治療で用いられたス テロイド刺および免疫調節剤には、燻々の副作用がある ことが問題であり、また酸性抗災症割は対症療法である れている。そこで、リウマチの治療生たは予防に有効で あり目つ副作用がないまたは難い斬視な抗リウマチ刺を 等の問題から、真に有効なリウマテ治療薬の出現が留ま 提供することが要留されている。本発明の主な目的の一 つは、新規な抗リウマチ剤を提供することにある。

【腺題を解決するための手段】先に、本発明者らは、抗 首活性および抗腫病活性を持つ断規な抗生物質を提供す ることを目的に、従来より有用な抗生物質の開発と専用 化の研究を促進してきた。その結果、土壌試料から新規 な商生物としてアミコラトプシス属に属する菌株を分離 ミコラトブシスsp. MX 299~95F4株が新しい・構造骨格を することに成功し、またこの菌株について命名されたア 有する複数の抗生物質を生産していることを見い出し [0005]

の細菌に抗菌活性を示し、また癌細胞の胃障を抑制する 抗腫瘍活性を育することを見い出した(平成7年12月 4 アイシンBと命名した。更に、これらの筋視抗生物質が 薬剤芸性質(メチシリン耐性菌等)をおくむ グラム原性 た。これら新規抗生物質2種を単離することに成功し、 それぞれにエポキシキノマイシンAねよびエポキシキノ

【0006】単に、本発明者与は研究を進歩だが、その 日出版の特度平 7-315542号明祖曾参照)。

はよびBと化学情造母格が共通するが別員の新規な化合 1924個を生産していることを見いだした。今回、これら 所規な化合物2個を単離することに成功し、それぞれに ゴボキシキ プマイシンC ねよびエボキシキ / マイシンD マイシンA および B生産的は、エポキシキノマイシンA **冶果、アミコサトプシス層に属する前配のエポキシキノ** と命名した。

行なっていたので、今回発見したエポキシキノマイシン CおよびエポキシキノマイシンDが抗リウマチ活性を有 節リウァチの動物與戦モデルであるコワーゲン航発関節 **校を抑制することを見いだした。また、先に本発明額ら** 【0001】また、本発明包らは、微生物の代酬産物の 中から抗リウマチ活性を示す物質を検索する研究を観慮 するか研究した。その結果、本発明にかかわるエポキン **ホノマイシンCおよびエボキシキノマイシンDが復性関** が発見したエポキシキノマイシンA およびエポキシキノ マイシンBも抗リウマチ活性を有することを見いだし

シキノケイツンのおよびエボキシキノマイツンロは、称 **定の間的に対して弱い抗菌活性を示したが、各種の癌細** 【0008】なお、水発明者らが今回新たに得たエポキ 間の問題を抑制する活性がかなり低いことが認められ た。これらの知見に基づいて、本籍明が完成された。

【ロロロ9】従って、如1の本発明においては、次の一

E) マススペクトル (m/'z) : 292 (M+H)・

290 (M-H) ·

F) 高分解能マススペクトル:狭駄値 292.0821(M+H)・

292.0804 部位長

λ max rm (ε) 296(18140)

三、 雅文 類吸収 スペケドラ: G) 公子共:Cr H ii NOs

v max(cm⁻¹) 3431, 1604, 1537, 1460, 1309, 1232, 1 1) 赤外據吸収スペクトル(K B r 錠剤法): 添付図画 の図2に示す。 ę (I) メルンード語音中で選択したDV吸収スペクトラ は帝付図面の図1に実績で示す。主なピークは次のとお

J) 13 C-NMRスペクトル (CD3 OD/TMS):商 065, 750

K) 1 H-NNRスペクトル (CD: OD/TMS): 版 4四回の図3に示す。

(2) エポキシキノマイシンDの理化学的性状 年図目の図4に示す。

A)外観及び性質:黄かっ色粉体,弱酸性物質

(III) 0.01N RCIーメタノール溶液中で測定したUV吸

A min 120 (E) 304 (18270), 364 (9750)

ーケは次のとおりてある。

長又くクトごは発年図画の図した段替が出す。 出なパー

かは状のとなりである。

(II) 0.01N NaOHーメルノード的第中で資格したUV **県内スペクトルは積付図目の図しに点積で示す。 出など**

λ max rum (ε) 297(17430)

りである。

B) 駿京: 163- 168℃(分解) C) 比線光度: (a) + 2 + 142。(c 1.0、メタノー

(式中、R はエポキシキノマイシンCでは水素原子を示 で表わされる化合物であるエボキシキノマイシンCおよ びエポキシキノマイシンD、あるいはこれらの塩が提供 し、またエポキシキノマイシンDでは塩素原子を示す)

塩などの有極塩基との塩、あるいは各種金属との塩、例 えばナトリウムのようなアルカリ金属との塩があり、こ 性物質であり、それらの塩としては第4級アンモニウム [0010] エポキシキノマイシンCおよびDは、 れらの塩も上記の抗リウマチ活性を有する。

【0011】次に、抗生物質エポキシキノマイシンC お

(1) エボキシキノマイシンCの理化学的性状 よびDの理化学的性状を配載する。

A) 外観及び性質:白色粉体,弱酸性物質 B) 随点: 168- 172℃(分解)

C) 比殻光度: (a) 🕫 + 128。 (c 1.0, メタノー

D) TLCのR「値:0.3」 Ξ

シリカゲル (Art.105715, メルク社製) の薄層クロマト ゲラフィーで風間溶媒としてクロロホルムーメタノール

(10:1) で展開して測定した場合

コラーゲン結発関節炎に対する効果を1群5~8のDBA/ イシンにおよびDの生物学的性状を次に記載する。 【0012】A)コラーゲン既発閲節炎抑制作用

付図面の図8に示す。さらに、抗生物質エポキシキノマ

ゲサフィーで展開浴媒 としてクロロホルムーメタノール (10:1) で展開して創建した場合

特闘平10-45738

3

324 (M-H) · . (H+M) E) マススペクトル (m/z) : 326

シリカゲル (Art.105715, メルク社製) の荷価クロマト

D) TLCのRf値:0.10

F) 高分解能マススペクトル:実製値 326.0431 (M+H)・

計算値 326.0417

ーゲンを等容器のフロイントのコンプリートアジュパントと共に乳化して Leg/mの投与液を作製した。これを 間後に同様の操作方法で乳化したテイブロコラーゲンの 0.1mlをマウスの腹腔内に投与して追加免疫を行ない関 1J雄性マウスを用いて調べた。すなわち、タイプロコラ マウスの尾根町の皮内に 0.1ml後種して感作した。3週 節炎を誘発させた。 5

(1) メタノール溶液中で遡定した D V 吸収スペクトル

G) 分子式: Cir Hiz NOs C 1 紫外糖吸収スペクトル: を添付図面の図5に実練で示す。主なピークは次のとお

(11) 0.01N NaOHーメタノール溶液中で測定した吸収

λ max rum (ε) 299(17590)

りである。

スペクトルは添付図画の図5に点機で示す。 主なピーク

(111) 0.01N HCIーメタノール溶液中で倒定したUVス ペクトルは際付図画の図5に破壊で示す。 生なパークは

λ max rum (ε) 304(18950), 367(9230)

は次のとおりである。

1) 赤外線吸収スペクトル (KBr錠剤法): 添付図面

A max rus (E) 297(18530)

次のとおりである。

1) n C-NMRスペクトル (CD1 OD/TMS): 商 K) 'H-NMRスペクトル (CD, OD/TMS):商

位図画の図7に示す。

v max(cm-1) 3438, 1643, 1533, 1281, 1200

の図らに示す。

の!ng/kgまたは 2ng/kgを最初のコテーゲン按値の日 上、あるいは手首、足首などの比較的大きな関節が発 赤、腫脹を示す場合、スコア3は1本の手や足全体が発 みられない場合、スコア1は四肢の指など小関節が1本 のみ発赤、睡腰を示す場合、スコア2は小関節が2本以 赤、腫脹を示す場合、さらにスコア4は1本の手や足の 金体的な顕践が最大限に達し、しかも関節の強直を伴っ ていると判断した場合をそれぞれ示す。結果を喪!に示 【0013】エポキシキノマイシンのA およびCの2mg /kgまたは 4mg/kg. ならびにエポキシキノマイシンB より1週間に3回、合計6週間腹腔内投与した。コラー ゲン誘発関節炎の抑制効果は前肢および後肢の発赤、瞳 の最高点は16)により評価した。スコブのは全く症状が 服ねよび強直の程度による0~4のスコア(4肢の合計 R

[0014]

8

\$

9

特間平10-45738

トキャッキノ

スポキシキノ

æ

2

Œ Ħ

#

(第3)

[6100]

サイツンの 8 5 2 20

TOX INCORDI-T

エールリッヒ

マウス白血角 し1210

1 C .. (# 8/81)

マイシンロ <u>00</u> ^ V 100 50.

(表1) ロシーゲン製物関係及び包含の

			T-	i		T .		Τ-	
2.7		B € 6	9.00±1.44	3. 83±0. 70#	1, 20 ± 0, 58 **	3. (0 ± 1. 34e	3. 30±1. 11s	6.80 ± 0.97	2, 40±0, §3es
к	故	日育ら	9. 25±1. 35	\$. 00 ± 1. 03**	8.00±0.84**	3. 00±1, 34*	2. 25±0. 85ee	6. 40±0.87	1. 80±0. 51 m
6 6	すりス		80	•	8 0	10	in.	6	מו
# #	(B/\$1/8n)		ı	~	•	-	N	es.	•
	関係に合物		異	エポキンチノマインンA		ドボキシキノセイツンB		1442474700	

対風間との間の食業施 + p < 0.05, + + p < 0.01 スコア:平均値上部停収数

の各種細菌に対する最低発酵阻止濃度は、次の扱2にし めず通りである。この抗菌スペクトルは日本化学療法学 会標準法に基ずき、ミュラーヒントン寒天培地で倍数希

/kg、エボキシキノマイシンBの1mg/kg、2mg/kg、 およびエボキシキノマイシンCの4mg/kgは打象に関節 [0015] エポキシキノマイシンAの2mg/kg、4mg なのスコンを苔型した。

所在により製造した。 [0017]

【0016】B) 抗動活性

|本発明による抗生物質エポキシキ/マイシンCおよびD |表3|

=	金色现象图点	委任元章组止制度(p.g/al)
5	4.4.4.4 4.4.7.0	4#+5+/ 44570
x9tco:+6x.79U0x.x1x	ůS.	os ^
スチヒロシャカス・アウレウス NS 9610	100	90.
スチヒロコッカス・アクレウス 18 16526	001	100
パストレラ・ピシシゲ np. 6395	20	. 20

キシキノ トインソ ひなみび オボキシキノマイツン Dの道・8 各種の癌細胞を用いて癌細胞の物類を50%抑制するエボ 【0018】C) 磁相阻的温控制活性

度 (ICss 値) を、NITT法 (「Journal of Immunologica 1 Nethods J 65巻, 55-60頁(1983)参照)で側定した。 その結果を扱うに示す。

	間子のう及
٦	** **
	看生枝、
	1.6ミクロンである。

8	
901	
B16 - B L 6	
マワス語 BIG - B L B	

【0020】D) 集体

が死亡個体はなく、また事性症状も見られなかった。ま た、エポキシキノマイシンCの 4mg ^kg/日を1週間に 3回、合計6週間腹腔内に投与したが死亡個体および毒 性症状を示す個体は見られなかった。エポキシキノマイ 【0021】 扱2の档果から明らかなように、本発明に よるエポキシキノマイシンCおよびDは、特定の齟齬に 対して弱い抗菌活性を有するから抗菌剤として有用であ しかし、扱3の結果から明らかなように、エボキシ キノマイシンCおよびDは各種の癌細胞の増殖を 100μ 1CR系雄性マウスにエポキシキノマイシンC およびエポ キシキノマイシンDの100mg/kgを腹腔内単回投与した シンこの適血動物に対する尊性は非常に低い。 B/miで抑制しなかった。

【0022】さらに第2の本発明によれば、アミコラト マイシンCおよびDの生産菌を栄養培地に培養し、その **筠豊物からエポキシキノマイシンC および (または) エ** ポキシキノマイシンDを採取することを特徴とする、抗 生物質エポキシキノマイシンCおよび(または)エポキ プシス層に属する、前配の一般式(1)のエポキシキノ シキノマイツンDの製造法が提供される。

コラトプシス sp. NKS99-95F4 株がある。この箇株は平成6年10月,微生物化学研究所において、百城県山台市 【0023】類2の本発明の方法で使用できるエポキシ キノマイシンCおよびDの生産間の一例としては、アミ

の土壌より分離された放標園で、MK299-95F4の閏株番号 が付された衛生物である。

【0024】このUK299-95F4株の菌学的性伏を次に配敵

1. 形態 基生菌糸はよく分枝し、ジクザグ代を困する。また分断 その表面は平滑であり、大きさは約 0.4~ 0.6× 1.1~ が認められる。気菌糸は直状あるいは不規則な曲伏で、 円商形~袰円形の断片または粒子様の構造に分断する。

見いる 動性粒子は配められない。

・ローボワーション・キノ・イメリカのカルー・ハール 色の記載について()内に示す標準は、コンティナー ニー・マニュアル (Container Corporation of America [0025] 2. 各種培地における生育状態 のcolor harmony manual) を用いた。

無色の発育上に、白の気菌糸をうっすらと替生して、溶 (I) シュクロース・暗酸塩寒天培地 (27°C培養)

(2) グルコース・アスパテギン寒天培地 (27℃培養) 解性色素は認められない。

うす費(2 ca. Lt Wheat~2gc. Bomboo)の発育上に、 白の気間糸を着生し、溶解性色素は黄を帯びる。

うす数茶 (3ie, Comel ~3ie, Cinumuon) の発剤上 5、27℃培養)

(3) グリセリン・アスパテギン象天培地 (1.5.Pー培地

に、白の気菌糸を着生して、俗解性色素は黄茶を帯び 6 (4) スターチ・無機塩寒天塔地 (ISP-培地4、27℃

無色の発育上に、白の気菌糸をうっすらと着生して、冷 【0026】(5) チロシン象天路街 (1SP-店地7. 解性色素は認められない。

うす資茶(21g. Mustard Jan)~灰味黄茶(31g. Ad obe Brown)の発育上に、白の気菌糸を替生し、溶解性 色素はうす黄茶を呈する。 27℃培養)

うす黄 (Zea. Lt Nieat) の発育上に、白の気間名をう っすらと自生し、治解性色素は配められない。 (6) 栄養摩天培地 (27℃培養)

(1) イースト・奥林華天信地 (1.5.P.上信他2、27℃倍

うす奠备 (31c. Lt Amber) の器界上に、白の気間会を **ラッすらと自生し、治解性色素は認められない。** S

特開平10-45738

(8)

特剛平10-45738

無色の発育上に、白の気間糸をうっすらと着生して、洛 熊色~うず貸(I 1/2cn, Cream)の発育上に、白の気 **創宗をうっすらと毎生し、治解性色素は認められない。** (9) スターチ寒天培地 (27℃培養)

亜色の発育上に、白の気菌糸をうっすらと蔔生して、溶 (10) リンゴ韓石灰象沢培也 (27℃培養)

智権自義は認められない。

[0027] 3. 生理的性質 解性色素は配められない。

(1) 生中温度範囲

した特別、10℃、50℃での生存は認められず、20℃~37 で、24で、27で、30℃、37℃および50℃の各温度で試験 **じの範囲で生育した。生育至適温度は27℃付近と思われ** 0.05%、ひも寒天 3.0%、 同7.0) を用い、10℃、20 ゲルコース・アスパサギン象形協協 (ゲルコース 1.0 8、1-アスパサギン0.05米、リン替水敷||カリウム

ISP-倍他4及びスターチ集天培地、いずれも27で培 (2) スターチの加水分解(スターチ・無償協奪天培也、

ロス、「SP-唐他」: ペプトン・イースト・転撃天壌 (3) メション種色素の生成 (トリプトン・イースト・ブ 地、ISPI指袖6:チロツン象天塔袖、ISPI培袖 21日間の倍養で、いずれの焙地においても陰性である。 7:いずれも27℃倍量)

【0028】(4) 核素源の利用性 (プリドハム・ゴドリ Dーグルコース、Dーフルクトース、イノシトール、D (5) リンゴ酸石灰の溶解 (リンゴ酸石灰象天体地、27℃ - マンニトールを利用して発育し、 L ーアラピノース、 シュクロース、ラムノース、ラフィノースは利用しな い。D-キシロースの利用の有無は判然としない。 一才與天语档、1SP一倍档9:21℃倍量) いずれの倍地においても関性である。

(6) 母韓祖の遠元反応(0.1%母韓カリウムの4ペプトン **培養後10日目頃よりリンゴ酸石灰の溶解が眺められ、** その作用は中等度である。

水、1.5.Pー倍性8、27℃倍費)

陪住である。

ターチの水解性及び硝酸塩の遠元反応はいずれも陰性で 50 **同し、分断を認める。気面糸は直状あるいは不規則な曲** ひにない。 無ちの指指で、無因しゃき致しゃき放送の結 月上に白の気間糸を割生する。一部の培地で溶解性色素 **ます、四角形~東田形の脚杆形たは間子類の構造に分析** する。倫生技、自由糸、胞子のう及び運動性胞子は認め は自ちるいは首茶を帯げる。メデニン数色素の生成、ス は、その形態上、基生菌糸はよく分枝し、ジグザク状を 【0029】以上の性状を契約すると、MK299-95F4株

【0030】ところで、MK299-95F4株の固体成分は、細 ース及びガラクトースを含み、細胞壁タイプIV型を示し た。全箇体中の還元額はアラビノース、ガラクトースを ル型であった。また、ミコール酸は合有せず、リン脳質 はPII型(ホスファチジルエタノールアミンを含みホス ファチジルコリン及び未知のグルコサミン含有リン脂質 を含まない)、虫類なメナキノンはMK – 9(Hi)で 閻翳にメン型の2.6 ージアミノピメリン製、アサピノ 含むA型であった。グリコレートテストの結果はアセチ あった。間防酸は16:0, 1-15:0, 16:1, 1-1 6:0及び17:0を主成分とした。

37頁、 1986年)に属するものと考えられる。アミコラトプシス属の既知箇種を検索すると、アミコラトプシス 【0031】以上の箱果よりみて、MK299-95F4株はアミ コラトプシス(Amycolatopsis) 属(文献:「Internatio コラトプシス・エスピー(Amycolatopsis sp.) MK299-95 nal Journal of Systematic Bacteriology」36巻, 29一 ・スルフレア(Amycolatopsis sulphurea) (文献! : 同 上:および文献2:「International Journal of Systems ミコラトプシス・スルフレアの当研究所保存徴株とを実 地に比較検討中である。現時点ではMK299-95F4株をアミ F4とする。なお、MX299-95F4株を工業技術院生命工学工 近禄の種としてあげられた。そこで、MK299-95F4株とア 葉技術研究所に高託申請し、平成7年10月17日、寄託番 tic Bacteriology 137 巻, 292- 295員, 1987年) が、 **号がFERM P-15243として受託された。**

培養する。ここで用いる栄養培地は、前配の生産歯が費 化できる炭素硬と窒素源を栄養成分として含有するもの は、アミロラトプシス層に属するエポキシキノマイシン CおよびDの生産菌を栄養培地に接てし、この培地中で 【0032】第2の本発明の方法を実施するに当って

とき妖霖顔、ならびにペプトン、肉エキス、糖寒粉、大 【0033】その栄養派としては、過常微生物の栄養源 として通常使用されるもの、例えば炭素源、窒素源、無 どう物、麦芽物、糖蜜、デキストリン、グリセリン、殿 4、塩化アンモニウムなどの窒素源、さらに燐酸ニカリ **グネシウム、塩化マンガンなどの無機塩が使用でき、必** 粉などの胶水化物や、大豆油、烙花生油などの油脂のパ 一、NZーアミン、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウ ウム、燐酸ナトリウム、食塩、炭酸カルシウム、硫酸マ シキノマイシンCおよびDを生産するのに使用値が利用 野により敬重金属例えばコパルト、鉄などを活加するこ とができる。栄養凍としては、その他。 抗生物質エポキ しうるものであればいずれの公知の栄養顔でも使用でき 豆粉、酵母エキス、カゼイン、コーン・スチープリカ 機塩などの同化できる栄養源を使用できる。例えば、

【0034】培地における上記のごとを栄養源の配合割

台は特に制約されるものでなく、広範囲に亘って変える ことができ、使用するエポキシキノマイシンCおよびD 当事者であれば簡単な小規模実験により容易に決定する は、培養に先立ち殺菌することができ、この殺菌の前ま 生産間によって、最適の栄養源の組成及び配合割合は、 ことができる。また、上記の栄養確からなる栄養培地 たは後で、増地のpHを6-8の配囲、特にpli 6.5-7.5の範囲に阿節するのが有利である。

CおよびD生産菌の培養は、一般の放標菌による抗生物 うてとができる。通常は好気条件下に培養するのが好適 【0035】かかる栄養培地でのエポキシキノマイシン 質の製造において通常使用されている方法に伴じて行な であり、撹拌しながら及び/または選気しながら行なぅ ことができる。また、培養方法としては静価培養、振と う培養、通気提拌をともなう液内培養のいずれも使用可 能であるが、液体培養がエポキシキノマイシンC および Dの大量生産に適している。

生物質を生産しうる範囲であれば、特に制限されるもの 【0036】使用しうる培養温度はエポキシキノマイシ ンCおよびD生産菌の発育が実質的に阻害されず、核抗 特に好ましいのは25~30℃の範囲内の温度を挙げること ができる。焙養は油塔はエポキシキノマイシンCおよび Dが十分に蓄積するまで継続することができる。その培 整時間は培地の組成や培養温度、使用温度、使用生産的 株などにより異なるが、適常は72~ 120時間の培養で目 の定置に用いられる円筒平板法により定量することがで 的の抗生物質を得ることができる。培養中の培助内のエ ポキシキノマイシンCおよびDの蓄積面はスタヒロコッ カス・アウレウス・スミスを使用して、通常の抗生物質 ではなく、使用する生産菌に応じて適宜選択できるが、

培養後、必要により、値通、遠心分離などのそれ自体公 合わせて使用することにより単離精製して目的の抗生物 【0037】かくして培養物中に苦傷されたエポキシキ ノマイシンCおよびDは、これを培養物から採取する。 に酢酸エチルなどを用いた洛蟆抽出や、吸蕾やイオン交 換能を利用したクロマトグラフィー、ゲルろ過、向流分 配を利用したクロマトグラフィーを単独でまたは、組み 質を採取することができる。吸替やイオン交換能を有す るクロマトグラフィー用担体としては、活性域、シリカ ゲル、多れ在ポリスチワンーツピロルベンゼン衝撃もし た、分離した箇体からは、適当な有機溶媒を用いた溶媒 抽出法や固体破砕による倍出法により固体から目的の抗 生物質を抽出し、上記と同様に単點精製することができ る。かくして、前配した特性を育する新規化合物エポキ その培養健徒を發性(pH 2・4) に羇驇し有機溶媒、特 知の分離方法によって培養物から菌体を除去した後に、 くは各種のイオン交換樹脂を用いることができる。虫 シキノマイシンCおよびDが得られる。

2 【0038】さらに、第3の本籍明では、前配の一般式

(式中、RはコポキシキノマイシンCでは水軽原子を形 ンCおよびエポキシキノマイシンD、ならびに次の一般 で扱わされる化合物である抗生物菌スポキシキノマイシ し、またエポキシキノマイシンDでは協戴原子を示す) 記

9

8

(式中、R はエポキシキノマイシンAでは協裁原子を示 で表わされる化合物である抗生物質エポキシキノマイシ ンA およびエボキシキノマイシンB、あるいはこれらの 協から選ばれる少なくとも一つの化合物を育効成分とし し、またエポキシキノマイシンBTは水繋原子を示す) て含有することを特徴とする抗リウマチ剤が提供され 【0039】第3の本発明による抗リウマチ剤において は、有効成分としてのエボキシキノマイシン類あるいは 【0040】類3の本発明による抗リウマチ剤で有効成 分として用いられるエポキシキノマイシンA およびエポ キシキノマイシンBは新規な物質であってこれらの物理 その製薬学的に許容できる塩は製薬学的に許容できる様 化学的性質の詳細は特願平 7ー315542号明細書に記載さ れており、またこの明細櫓には、前配のアミコラトブシ ス sp. MX 299-95F4株の培養によるそれらの製造法も 粉等と遅和されている形の組成物であることができる。 用の固体または液体担体、例えばエタノール、水、 記載されてある。

【0041】エポキシキノマイシンAおよびBの物理化

- (1) エボキシキノマイシンAの理化学的性状 羊的性質の主なところを次に記載する。
 - ハ) 外観および性質:淡黄色粉体、弱酸性物質
- C) 抗糖光度: (a) + 2 +44 6" (c 0 51. メソノ 3) 陸点: 168-- 173℃ (分解)
- D) TLCのR f値:0 28
- シリカゲル (Art 105715, メルク社略) の御風ケロマト

6

特間平10-45738

ゲラフィーで風間冶鰲としてクロロホルムーメタノール (10:1) で展開して測定した場合。

F)群外は吸収スペクトル:メタノール治療中で過程し たUV吸収スペクトルの虫など一クは次のとおりであ [0042] E) 分子式: C14 H16 NO. C1

λ mnx rm (ε) 236(sh. 8900), 255(sh. 5900), 325(80 00), 370 (sh. 2700)

v max (cm.1) 3450, 1710, 1670, 1600, 1520, 1460, 1 G)赤外糠吸収スペクトル(KBr駐剤法) 340, 1230

【0043】(2) エポキシキノマイシンBの理化学的性

A)外収及び性質:液質色粉体、頻酸性物質

C) 比較光滑: (a) • 23 + 32.2° (c 0.51, メダン B) 路点: 178- 1847 (分解)

D) TLCのR1値:0.52

サラフィーで展開浴盤としてクロロホルムーメタノール シリカゲル (Art.105715, メルク社製) の第回クロマト (10:1) で風間して磁度した場合。

R

F)無料類吸収スペクトル:メかノール路液中で資産し [0044] E) 分子式: Cia Hii NOs

たロV吸収スペクトルの出なパークは次のとおりでお

V BAX (cm.1) 3430, 1710, 1660, 1610, 1530, 1340, 1 1 max 12 (c) 237 (6100), 253 (sh. 5400), 326 (6300) C) 形外類吸収スペクトラ(K B L 配創符) 230 【0045】如3の本発明による抗リウマチ剤で有効成 らびにエポキシキノマイシンA およびBは、前配のとお 佐は投与に適した形態をとることができ、特に経口的投 分として用いられるエポキシキノマイシンCおよびDな マイシンこねよび ひならびにエポキシキノマイシンA お よびBは特に抗リウマぞ剤として使用される場合に、そ れらの投与面は症状により異なるが一般に成人一日面10 必要により1~3回に分けて投与するのがよい。投与方 り、慢性関節投リウマチの動物攻撃モデルであるコラー **~2000mg、好ましくは20~ 600mgであり、庶状に応じて** ゲン時発問節炎を抑制する活性を有する。 エポキシキノ **与あるいは静脈的投与が留ましい。**

【0046】エポキシキノマイシンA~Dは、前配に示 硬化症、粘筋性動脈周囲炎、液体性大腸炎および苔単性 間尿内さどの自己免疫的患の予防または治療にも有効に するから、便住関節リウマチのみならず、自己免疫軽減 または抑制剤として、全身性エリテマトーデス、全身性 すとおり、コラーゲン熱発関節炎に対する抑制作用を有 意用することが明冷できる。

8 [発明の東値の形態] 次に其値例によりは発明を更に詳

間に説明するが、本発明は下配の実施例に限定されるも

【0048】 <u>製施倒し</u> 抗生物質エポキシキノマイシン CおよびDならびにエポキシキノマイシンA ねよびBの (A) グリセリン 0.5%、シュークロース 2%、大豆 天料面塔地に培養したアミコラトプシスsp. MX299-95F 0.5%、塩化コバルト 0.001%を含む液体培地(plf.0)に 常法により 120℃で20分域倒した。これ5の倍地に、単 4 株 (FERN P-15243) を接種し、その後30℃で5日間 パクトーソイトン・1%、粉末酵母エキス 0.3%、硫酸 アンホーケム 0.2%、投製セガツかん 0.2%、シリコー ンオイル I 満を合む液体培地 (pl17.4に調整) を三角フラ **スコ(500m1砕) に 110m1ずつ分注し、格法により 120℃** で20分成菌した。その後、これら培地に、上記種母培養 液をそれぞれ2■1ずつ接債し、27℃で4日間回転扱とう **韓数)を三角フラスコ(500m1容) に 110m1ずつ分注し、** 【0049】グリセリン 2%、デキストリン 2%、 **歩 一名、長岐群母一名、ローン・スチープ・シセー** 回転擬とう培養した。これにより種母培養液を得た。 拍集した。

【0050】このようにして得られた培養液を遠心分離 6 N-NCI により足2 にした後に緊急 プチル 1.8 L で抽 出して、酢酸ブチル価を無水硫酸ナトリウムにより乾燥 した。酢酸ブチル間を咸圧下で濃縮乾固し、現途をメタ ノール50mlに浴かしくキサン50mlで2回浴をした。メタ ノール層を城圧下で遺稿乾固すると茶色の油状物(980 米 (10:1、5:1、3:1)で国文治出するとエボキ シキノマイツンAがIBmg、エボキツキノレイツンBが19 ng、エポキシキノマイシンCねよびDの個合物が 170mg 得られた。この個合物のSlngをシリカゲルTLC(Merc シキノマイシンCが13mg得られ、また費かり色粉末のエ ポキシキノマイシンDが23mg(得られた。すなわちエポキ 末として13mgの収量で得られ、またエポキシキブマイシ **ソDが階点 163~ 168℃(分解)の質かり色粉末として** して簡体を除去した。培養ろ被 1.8リットル (L) は、 mg) か(得られた。この油状物をシリカゲルカラム(Nerc k.Kleselgel 60, 120ml) に付し、トルエンーアセトン k.Art.105715, クロロホルムー10%合水メタノール=1 0:1で3回展開)で分離特製すると白色固体のエポキ シキノマイシンCが酷点 168~172℃ (分解) の白色粉

(B) なお、前配の(A) 項と同様にして得られた培養 (L) を、6 N —IICI によりpH2にした後に酢酸ブチル 2.551で抽出し、酢酸ブチル圏を無水硫酸ナトリウムに し、メタノール個を減圧下で濃縮乾固した。ほられた現 値をクロロボルムーメタノールー水(50 :10:40.100m 棟を碑過して롈体を分離した。培養ろ液2.55リットル 資をメタノール50mlに浴かしヘキサン50mlで2回洗净 より乾燥した。酢酸ブチル圏を減圧下で適箱乾固し、 23mgの収録で得られた。

30

特団平10-45738

【図2】エポキシキノマイシンCのKBr錠剤法で例定 した赤外様吸収スペクトルである。

油状物(0.515g) が得られた。この油状物をシリカゲル

1) で分配し、下層を減圧下で濃縮乾固すると、茶色の

た。得られた活性画分を同条件のシリカゲルカラムクロ

製、50m1)に付し、トルエンーアセトン混合铬煤(10:

カラムクロマトグラフィー (Kleselgel 60. メルク社 1. 7:1, 5:1, 3:1, 2:1) で耐次倍出し マトグラフィーに付し、トルエンーアセトン混合溶媒 エポキシキノマイシンA および B の混合物が 124mg 得ら 媒:クロロホルムーメタノール, 20:1)にかけて分離 **捕製した。エボキシキノマイシンAが船点 168~ 173℃** (分解)の改黄色粉末として20mgの収量で得られ、また エポキシキノマイシンBが駿点 178~ 184℃ (分解) の

(50:1,20:1,10:1,7:1)で層次倍出した。 れた。この混合物の35mgをシリカゲルTしC(展開浴

(内部標準:トリメチラション) にて風鬼したプロトン 【図4】エポキシキノマイシンCの雌メタノール協演 【図3】エポキシキノマイシンCの量メタノール溶液 核路製料婦スペクトルである。

(内部環準:トリメチルシサン) にて測定した状態13技 磁気共鳴スペントルかある。

タノール治液中のそれぞれの紫外線吸収スペクトルであ 【図5】 ロボキシキノマイシンロのメダノーラ箔浦中、 9

【図6】エポキシキノマイシンDのKBr錠剤法で測定 【図1】エポキンキノマイツンDの無メダノール治療 した赤外様吸収スペクトルである。

(名の質量・トレメチラッサン) にて運転したプロトン 核磁気共鳴スペクトルかある。

(内部標準:トリメチルション) にて側定した炭素13核 【図8】エポキシキノマイシンDの難メタノール溶液 磁気共鳴スペクトルである。

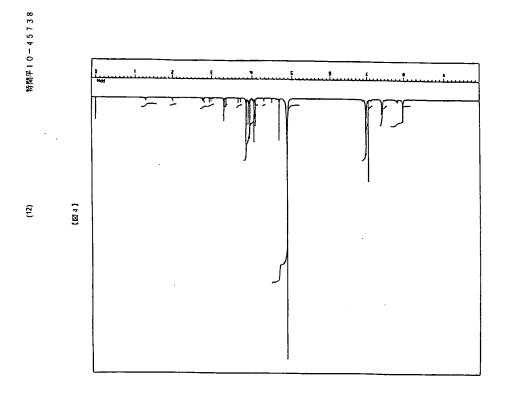
グー13M NaOH - メタノーに破壊中程が10.01 NCI - パー13M NCI - パー13M NCI - パー13M NCI - パー13M からい - パー13M NCI - パー13 タノール語演中のそれぞれの概外類吸収スペントルかめ

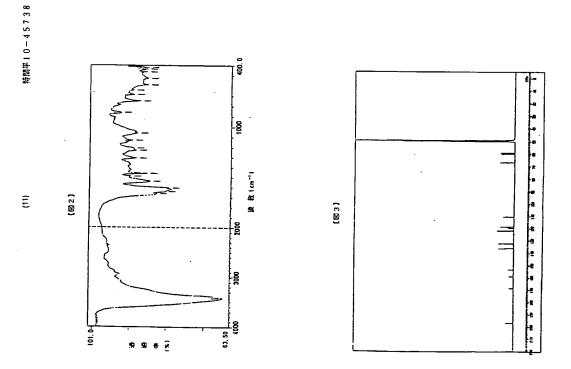
【図1】 Hボキシキノセイツンこのメダノード価値中、

波数色粉末として10mgの収置で得られた。

【図面の簡単な説明】

500. \$6.0 **4**00 300.0 230.0 200.0 500.0 430.0 0.00 [| | 350.6 25 (mm) 300.0 130.0 9.00

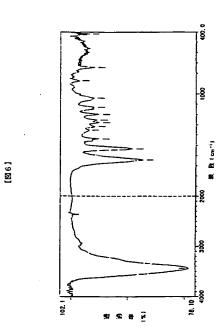


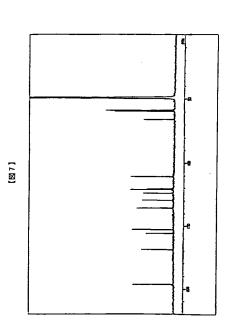


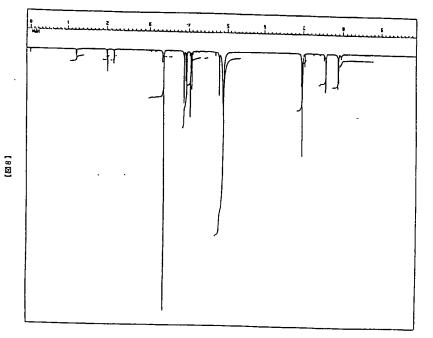


特刚平10-45738

3







フロントページの統合

	東京都新宿区内藤町上番地26 秀和レジデ		1	种萩川県多ケ崎市本村5丁目8番1-207	-	神衰川県横浜市旭区さちが丘川開地3 如	1 グリーンコーボ102
票	机机机	ンス405号	一世 品中	机械	松大 田野	5/11/A	11:1
煙	11. EX	7		#	4	舞	-
(72)発明者 清田			(72)発明者		(72)発明者		
飯沼 寛偶	神奈川県横浜市緑区白山 4 丁目61番17号	4 力	神奈川県校瀬市校西四丁目6番7号	長種 博	東京都大田区田園舞布太町3番17号		
(72)発明者 飯沼		(72)発明者 澤 力		(72)発明者			

(12)発明台 石塚 組合 静岡県二島市西古町6倍59 バストラル アイムを信約111

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

M BLACK BORDERS
☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
☐ FADED TEXT OR DRAWING
☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
□ other:

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.